

番茄内生菌分离及其 ERIC - PCR 指纹图谱分析*

李艳琴 申 泉 刘彬彬 张 华 赵立平**

(山西大学化学生物学与分子工程教育部重点实验室 太原 030006)

摘要:介绍了一种分离植物内生菌和研究其多样性的方法。用无菌水、化学试剂、紫外线和机械去表皮4种方法对番茄植株进行处理,然后分别用牛肉膏蛋白胨、高氏一号和PDA(加链霉素抑制细菌生长)3种培养基分离内生菌。确定了最适宜的去除非内生菌的方法。经分离、纯化得到148株大小、形态、颜色各异的内生菌分离物。对其中43株进行ERIC-PCR扩增,32株有扩增条带的菌株可分为28种。把纯化的菌株分别与番茄早疫病菌进行平板对峙培养。筛选出抑菌效果较好的3株菌。

关键词:番茄内生菌,分离纯化,ERIC-PCR

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2003) 05-0089-05

IDENTIFICATION OF ENDOPHYTES FROM TOMATO SEEDLINGS AND ANALYSIS OF DNA FINGERPRINTS USING ERIC-PCR

LI Yan-Qin SHEN Quan LIU Bin-Bin ZHANG Hua ZHAO Li-Ping

(*Chemical Biology and Molecular Engineering Laboratory of Education Ministry, Shanxi University, Taiyuan 030006*)

Abstract: A new method of identification and study of diversity of endophytes was described in this paper. The seedlings of tomato were treated using four methods, sterile water, chemical reagents, ultraviolet radiation and mechanical to peel off, respectively. Then endophytes were isolated using plates of beef-peptone, Gao's I and PDA respectively. The optimal method of wiping off non-endophytes was determined. We had obtained 148 isolates of endophytes with different size, shape and color. 43 strains of 148 were amplified using method of ERIC-PCR. The results showed that 32 strains with amplified bands could fall into 28 classes. The purified bacteria were cultured confronting to leaf blight pathogen of tomato to screen high resistant strain. Three bacteria strains with high resistance to pathogen were obtained.

Key words: Tomato endophyte, Identify and purified, ERIC-PCR

* 国家自然科学基金资助项目 (No. 39770509)

Project Granted by Chinese National Natural Science Fund (No. 39770509)

山西省自然科学基金 (No. 20021080)

** 现在上海交通大学生命科学技术学院

收稿日期: 2002-09-06, 修回日期: 2002-11-23

在不同的植物体内都存在大量的内生菌,它们能够定植在植物细胞间隙或细胞内,并与寄主植物建立和谐联合关系^[1]。虽然对其在植物组织内的生物学作用还缺乏了解,但是许多内生菌已作为生物防治剂、固氮菌剂和植物促生制剂,广泛应用于实验室、温室和大田。内生菌还是一个很好的外源基因载体^[2]。

在许多情况下,细菌的传统分类方法难以区分同一种类中极为相近的菌株。近年来,随着生物化学和分子生物学技术的发展,一些全新的基于核酸序列的分子分类方法为细菌的分离、鉴别提供了有力的工具^[3]。

在细菌中发现的 ERIC 序列 (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus, 细菌基因间的重复共有序列) 是一段长为 126bp 的反向重复序列^[4], 由于不同的菌株其 ERIC-PCR 扩增产物的电泳图谱不同, 故可利用该图谱对这些菌进行分类和微生物多样性研究。Judd 等用 ERIC-PCR 对蔓生型大豆根瘤菌血清簇 123 个菌株进行系统发育分析与 RFLPs 分析的结果吻合^[5]。本文利用该方法对番茄内生菌进行分类和微生物多样性研究。

1 材料与方法

1.1 供试植物与培养基

供试植物: 番茄植株 (早魁); 栽培用土壤: 前茬分别为黄瓜 (1#) 番茄 (2#) 白菜 (3#) 茄子 (4#) 棉花 (5#); 培养基: 牛肉膏蛋白胨细菌培养基、高氏一号培养基、PDA 培养基 (加链霉素抑制细菌生长)。

1.2 ERIC 特异性引物序列^[6]

ERIC1R: 3'-CACTTAGGGGTCCTCGAATGTA-5'; ERIC2: 5'-AAGTAAGTGACT-GCCGTCAGCC-3'。

1.3 植株处理方法及内生菌的分离

称取番茄苗样品 4 份各 1g, 用清水洗去污泥后, 在超净台中分别进行以下 4 种不同的处理。(1) 水处理: 用无菌水清洗数 10 次后, 研碎, 加入到装有 10mL 无菌生理盐水和玻璃珠的三角瓶中, 涡旋振荡 1min。(2) 化学处理: 无菌水清洗数 10 次后, 用 75% 酒精浸泡 5min, 再用 0.1% 的氯化汞浸泡 5min 后, 立即用无菌水洗涤 3 次, 研碎, 其它步骤同上。(3) 物理处理: 用无菌水清洗数 10 次后, 再用紫外线照射 1h, 研碎, 其它步骤同上。(4) 机械处理: 无菌水清洗数 10 次后, 用无菌刀片切除其表皮, 研碎, 其它步骤同上。将上述悬液分别离心 (1,500 g, 5min), 上清液做梯度稀释, 涂于 3 种培养基平板上, 28℃ 培养一周, 计数。

1.4 筛选内生菌的依据

根据分离平板上菌落的大小、形态和颜色, 挑取单菌落 148 株, 尽量使其能代表所分离到的全部内生菌。又结合单细胞形态, 选出 43 株进行 ERIC-PCR, 其中一部分为菌落形态相似, 单细胞形态不同; 一部分为菌落形态不同, 单细胞形态相似; 一部分为菌落、单细胞形态均不同; 还有一部分为菌落、单细胞形态均相似。43 株菌中有 31 株来自牛肉膏蛋白胨培养基, 12 株来自高氏一号培养基, 由于分离到的真菌很少, 故未选 PDA 平板上的菌。

1.5 PCR 反应简易模板的制备

挑取单菌落溶于 100 μ L 高纯水中, 在沸水中煮 1min 裂解菌体, 使 DNA 释放出来,

直接作为 PCR 反应的模板^[7]。

1.6 PCR 反应与结果分析

在 25 μ L 的 PCR 反应体系中, DNA 模板用量约为 30ng。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 7min, 94 $^{\circ}$ C 变性 1min, 52 $^{\circ}$ C 退火 1min, 65 $^{\circ}$ C 延伸 8min, 30 个循环, 65 $^{\circ}$ C 最后延伸 16min, 4 $^{\circ}$ C 停止反应。用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物, GDS8000 凝胶图象分析仪照相。

1.7 数据表示方法

表 1 中数据表示方法为科学计数法。

2 结果与分析

2.1 去除非内生菌的方法

在研究内生菌的过程中, 内生菌的分离方法是很重要的, 灭菌过轻或过重都会造成对植物内生菌调查准确性的影响。我们用 4 种方法处理植株, 结果见表 1。

由表 1 可以看出, 水处理后所得菌量明显多于其它 3 种方法处理后所得菌量, 这是由于无菌水不能完全去除植株表面的微生物而造成的。化学方法处理后得到的菌量极少, 可能是由于化学试剂渗入植株内部, 用无菌水冲

洗表面不能阻止其在植物内部作用, 故大量内生菌被杀死。切割去表皮的同时把表层的内生菌也去掉了。所以我们选择用物理处理的方法来消除非内生菌的影响。

2.2 不同土壤对内生菌种类及数量的影响

分别取前茬为黄瓜 (1#) 番茄 (2#) 白菜 (3#) 茄子 (4#) 棉花 (5#) 的 5 种土, 种植番茄, 用物理方法处理植株, 分离内生菌, 结果见表 2。

从表 2 看出: 前茬为番茄、茄子 (都属于茄科) 再种番茄, 其内生菌菌量远少于前茬为其它科植物的内生菌。从植株长势来看也远不如前茬为其它科植物的番茄苗,

这也符合田间轮作时尽量选择亲缘关系远的植物有利于生长。分离到的内生菌中除 4# 土外均为细菌占绝大多数, 真菌极少。

2.3 ERIC-PCR 图谱及其聚类分析

经分离、纯化得到 148 株大小、形态、颜色各异的内生菌分离物。对其中 43 株进行 ERIC-PCR 扩增, 结果 32 株有扩增条带, 11 株无扩增条带 (7 株来自高氏一号培养基, 4 株来自牛肉膏蛋白胨培养基)。图 1 为部分菌株的 ERIC-PCR 电泳图谱。

表 1 4 种处理方法 3 种培养基上的菌量变化 (cfu/g)

处理方法	细菌	放线菌	真菌	总菌量
水处理	1.08E+05	1.84E+04	5.20E+01	1.26E+05
化学处理	1.80E+0	1.10E+0	0	2.90E+0
物理处理	9.00E+04	9.20E+03	2.60E+0	9.92E+04
机械处理	5.40E+05	5.80E+03	1.30E+0	5.98E+04

表 2 不同土壤中的番茄内生菌菌量 ($\times 10^3$ cfu/g)

土壤	1#	2#	3#	4#	5#	占总菌的比例 (%)
细菌	7.6	2.28	13.2	1.08	9.0	79.4
放线菌	2.26	0.38	1.74	2.00	0.92	18.2
真菌	0.076	0.232	0.58	0.136	0.272	3.1
合计	9.936	2.892	15.52	3.216	10.192	

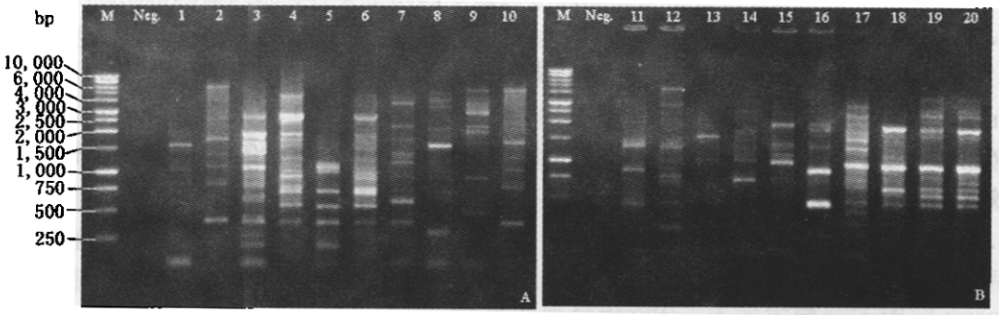


图1 部分番茄内生菌的 ERIC-PCR 指纹图谱

M 1kb ladder 分子量标记, Neg. PCR 空白对照, 1~20 分离到的内生菌

ERIC-PCR 结果表明, 虽然有些菌株的单细胞形态和菌落形态都很相似, 但其 ERIC-PCR 指纹图谱却不相同 (如 17, 18, 19), 说明它们不属于同一种菌; 有些菌株的单细胞形态和菌落形态很相似, 其 ERIC-PCR 指纹图谱也很一致 (如 3 和 6, 19 和 20), 说明它们是同一种菌。

用 SPSS 软件 (SPSS Inc.) 中的 Euclidean Distance 对 ERIC-PCR 图谱进行聚类分析, 结果 32 株菌分为 28 种。

2.4 平板对峙培养

在适于早疫病菌生长的 PDA 平板上同时用无菌牙签点上内生菌和早疫病菌, 28℃ 培养 2 周, 选出抑菌圈较大的菌 (图 2)。

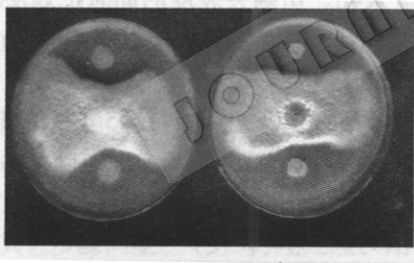


图2 对峙培养

中间: 早疫病菌, 两边: 内生菌

3 讨论

植物内生菌可以系统地分布于植物组织内, 并有足够的碳源、氮源, 而且受到植物组织的保护, 比暴露于恶劣环境 (强日光、紫外线、暴风雨等) 的附生菌更具有稳定的生存环境, 作为生防菌及外源基因载体更易于发挥作用。但植物内生菌研究中, 方法和手段方面仍存在一些问題, 内生菌的确定就是其中之一, 灭菌过轻扩大内生菌的生物多样性, 过重又导致许多内生菌的丢失, 我们确定的分离内生菌的方法是相对的而不是绝对的。

由于 ERIC 序列的分布和数目在不同的细菌中大相径庭, ERIC-PCR 指纹图谱又具有较高的稳定性和可重复性, 所以常被用于细菌的分子鉴定和分类。然而 ERIC 序列主要存在于肠道细菌中, 到目前为止所知道唯一例外的是 *Vibrio cholerae*^[8]。但在实际工作中, 用 ERIC-PCR 对噬菌体、真菌、植物及动物的基因组 DNA 进行扩增时, 发现都有扩增条带^[9]。我室在这方面的研究表明: 对含有 ERIC 序列的基因组进行 ERIC-PCR 时, 扩增片段绝大多数为 ERIC 序列附近的 DNA 片断; 对不含有 ERIC 序列的基因组进行

ERIC-PCR时, 扩增片段为两端与ERIC引物同源性较高的DNA片段。所以我们在利用ERIC-PCR进行细菌分类时, 应结合菌落及细胞形态综合考虑。Giovanni等人的工作表明, 蜡状芽孢杆菌不能产生ERIC-PCR图谱。我们的工作也出现11株菌无扩增条带, 这可能是因为基因组中没有与ERIC引物同源性较高的DNA片段, 也可能是因为细胞裂解方法不合适, 未释放出DNA, 真正的原因还需进一步证实。

参 考 文 献

- [1] Kloepper J W, Beauchamp C J. *Can J Microbiol*, 1992, **38**: 121 ~ 123.
- [2] Andrews J H. *Ann Rev Phytopathol*, 1992, **30**: 603 ~ 635.
- [3] 阎爱民, 陈文新. *微生物学通报*, 1997, **24** (6): 362 ~ 364.
- [4] Hulton C S J, Higgins C F, Sharp P M. *Molecular Microbiology*, 1991, **5** (4): 825 ~ 834.
- [5] Adam K J, Maria S, Michael J S, *et al.* *Appl Environ Microbiol* 1993, **59** (6): 1702 ~ 1708.
- [6] Versalovic J, Koeuth T, Lupski J R. *Nucleic Acids Research*, 1991, **19** (24): 6823 ~ 6831.
- [7] 赵立平, 肖虹, 李艳琴, 等. *应用于环境生物学报*, 1999, **5** (增): 30 ~ 33.
- [8] Bachellier S, Clement J M, Hofnung M. *Red Microbiol*, 1999, **150**: 627 ~ 639.
- [9] Gillings M, Holley M. *Letters in Applied Microbiology*, 1997, **25**: 17 ~ 21.